

3/3,AB/2

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2007 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0007387658

WPI ACC NO: 1995-328255/

XRAM Acc No: C1995-145644

Refining oil compsns., esp. fish oils - to give prods. contg. higher concns. of polyunsatd. fatty acids

Patent Assignee: NORSK HYDRO AS (NHYD)

Inventor: BREIVIK H; HARALDSSON G; HARALDSSON G G

17 patents, 55 countries

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update
WO 1995024459	A1	19950914	WO 1995NO50	A	19950307	199542 B
AU 199519639	A	19950925	AU 199519639	A	19950307	199601 E
ZA 199501867	A	19960131	ZA 19951867	A	19950307	199610 E
NO 199604400	A	19961016	WO 1995NO50	A	19950307	199702 E
			NO 19964400	A	19961016	
EP 749468	A1	19961227	EP 1995912522	A	19950307	199705 E
			WO 1995NO50	A	19950307	
NZ 282508	A	19970922	NZ 282508	A	19950307	199745 E
			WO 1995NO50	A	19950307	
JP 9510091	W	19971014	JP 1995523384	A	19950307	199751 E
			WO 1995NO50	A	19950307	
AU 686348	B	19980205	AU 199519639	A	19950307	199813 E
HU 76707	T	19971028	WO 1995NO50	A	19950307	199815 E
			HU 19962440	A	19950307	
KR 1997701773	A	19970412	WO 1995NO50	A	19950307	199817 E
			KR 1996704872	A	19960904	
EP 749468	B1	19990519	EP 1995912522	A	19950307	199924 E
			WO 1995NO50	A	19950307	
DE 69509756	E	19990624	DE 69509756	A	19950307	199931 E
			EP 1995912522	A	19950307	
			WO 1995NO50	A	19950307	
US 5945318	A	19990831	WO 1995NO50	A	19950307	199942 E
			US 1996714042	A	19960906	
ES 2133752	T3	19990916	EP 1995912522	A	19950307	199946 E
CN 1143384	A	19970219	CN 1995192022	A	19950307	200059 E
RU 2151788	C1	20000627	WO 1995NO50	A	19950307	200061 E
			RU 1996118495	A	19950307	
CA 2185018	C	20001219	CA 2185018	A	19950307	200103 E
			WO 1995NO50	A	19950307	

Priority Applications (no., kind, date): GB 19944483 A 19940308

Patent Details

Number	Kind	Lan	Pg	Dwg	Filing Notes
WO 1995024459	A1	EN	56	2	
National Designated States,Original: AU BB BG BR CA CN CZ EE FI GE HU JP					
KP KR LK LR LT LV MG MN MX NO NZ PL RO SI SK TT UA US UZ VN					
Regional Designated States,Original: AM AT BY CH DE DK ES FR GB IE IT KE					
KG KZ LU MD MW NL PT RU SD SE TJ					
AU 199519639	A	EN			Based on OPI patent WO 1995024459
ZA 199501867	A	EN	53	0	
NO 199604400	A	NO			PCT Application WO 1995NO50
EP 749468	A1	EN		0	PCT Application WO 1995NO50

					Based on OPI patent	WO 1995024459
Regional Designated States,Original:					DE DK ES FR GB IE IT NL	
NZ 282508	A	EN			PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459
JP 9510091	W	JA	48	0	PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459
AU 686348	B	EN			Previously issued patent	AU 9519639
					Based on OPI patent	WO 1995024459
HU 76707	T	HU			PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459
KR 1997701773	A	KO			PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459
EP 749468	B1	EN			PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459
Regional Designated States,Original:					DE DK ES FR GB IE IT NL	
DE 69509756	E	DE			Application	EP 1995912522
					PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	EP 749468
					Based on OPI patent	WO 1995024459
US 5945318	A	EN			PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459
ES 2133752	T3	ES			Application	EP 1995912522
					Based on OPI patent	EP 749468
RU 2151788	C1	RU			PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459
CA 2185018	C	EN			PCT Application	WO 1995NO50
					Based on OPI patent	WO 1995024459

Alerting Abstract WO A1

Treating an oil compsn., which contains satd. and unsatd. fatty acids in the form of triglycerides, in order to obtain a refined prod. with a higher concn. of polyunsatd fatty acids, comprises: (a) subjecting the oil compsn. to a transesterification reaction with a 1-6C alcohol (the amt. of which is not more than 15 molar equivs. based on the triglycerides present) under anhydrous conditions, and in the presence of a lipase active, to preferentially catalyse transesterification of the satd. and monounsatd. fatty acids; and (b) sepg. a residual fraction (enriched in glycerides of polyunsatd. fatty acids) from a fraction contg. monounsatd. and satd. fatty esters produced by step (a).

USE - The process is esp. useful for increasing the concns. of EPA and DHA in fish oil compsns. EPA and DHA are useful in the pharmaceutical and food supplement industries.

ADVANTAGE - The new process are well adapted for use in integrated processes for mfr. of compsns. having high concns. of EPA and/or DHA The processes may also be applicable to oil prods. contg. polyunsatd. fatty acids from other sources, e.g., fermentation prods. and vegetable and plant oils.

Original Publication Data by Authority

Original Abstracts:

This invention relates to a process for treating an oil composition containing saturated and unsaturated fatty acids in the form of triglycerides, in order to obtain a refined product with higher concentrations of the polyunsaturated fatty acids.

This invention relates to a process for treating an oil composition containing saturated and unsaturated fatty acids in the form of triglycerides, with at least some of the unsaturated fatty acids being polyunsaturated, in order to obtain a refined product with a higher concentration of the polyunsaturated fatty acids.

This invention relates to a process for treating an oil composition containing saturated and unsaturated fatty acids in the form of triglycerides, in order to obtain a refined product with higher concentrations of the polyunsaturated fatty acids. Basic Derwent Week:
199542

?

副 本 甲 第 5 号 証

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-510091

(43) 公表日 平成9年(1997)10月14日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	F I
C 1 2 P 7/62		9637-4B	C 1 2 P 7/62
C 0 7 C 67/03		9279-4H	C 0 7 C 67/03
67/54		9279-4H	67/54
67/60		9279-4H	67/60
69/587		9279-4H	69/587

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-523384
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)3月7日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)9月6日
 (86) 国際出願番号 PCT/NO95/00050
 (87) 国際公開番号 WO95/24459
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)9月14日
 (31) 優先権主張番号 9404483.1
 (32) 優先日 1994年3月8日
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)

(71) 出願人 ノルスク・ヒドロ・アクシエセルスカーブ
 ノルウェー国、0240 オスロ (番地なし)
 (72) 発明者 ブレイヴィック、ハラルド
 ノルウェー国、3942 シェルスヴィック、ウ
 ラヌスヴェイエン 22
 (72) 発明者 ハラルドソン、グドムンドゥール・ゲー
 アイスランド国、110 レイキャヴィック、
 スコガラス 11
 (74) 代理人 弁理士 曾我 道照 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 精油組成物

(57) 【要約】

本発明は、より高い濃度の多不飽和脂肪酸を有する精製された生成物を得るために、トリグリセリドの形態で飽和および不飽和脂肪酸を含有する油組成物を処理する方法に関する。

【特許請求の範囲】

1. より高い濃度の多不飽和脂肪酸を有する精製された生成物を得るために、トリグリセリドの形態で飽和および不飽和脂肪酸を含有する油組成物を処理する方法であって、次の工程：

(a) 該油組成物を、実質的に無水の条件下、かつ飽和および単不飽和脂肪酸のエステル交換を優先的に触媒するに活性なリパーゼの存在下に、反応中に存在する $C_1 \sim C_6$ アルコールの量が、存在するトリグリセリドに基づいて15モル当量を超えない量である $C_1 \sim C_6$ アルコールを用いて、エステル交換反応に供する工程；そしてその後で、

(b) 多不飽和脂肪酸のグリセリドに富む残余画分を、前記リパーゼで触媒されるエステル交換反応により製造された飽和および単不飽和脂肪酸エステルを含有する画分から分離する工程；
を含むことを特徴とする、方法。

2. 前記リパーゼが固定化された形態である、請求項1に記載の方法。
3. 前記 $C_1 \sim C_6$ アルコールが無水エタノールである、請求項1または2に記載の方法。
4. 前記 $C_1 \sim C_6$ アルコールの量が、存在するトリグリセリドに基づいて2～5モル当量である、請求項1～3のいずれか1つに記載の方法。
5. 前記エステル交換反応が室温で実施される、請求項1～4のいずれか1つに記載の方法。
6. 前記分離工程(b)が1またはそれ以上の分子蒸留を含む、請求項1～5

のいずれか1つに記載の方法。

7. 前記油組成物が $n-3$ 多不飽和脂肪酸を含有する海産油組成物または発酵生成物である、請求項1～6のいずれか1つに記載の方法。

8. 前記リパーゼが、エイコサペンタエン酸(EPA)とドコロヘキサエン酸(DHA)の双方に対して実質的に不活性である、請求項1～7のいずれか1つに記載の方法。

9. 前記リパーゼが、シュードモナス・エスピー(*Pseudomonas sp.*)のリバ

ーゼまたはシュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) のリパーゼである、請求項8に記載の方法。

10. 少なくとも40重量%のEPA+DHAを含有する組成物の調製のための、請求項7~9のいずれか1つに記載の方法であって、さらに次の工程：

(c) アルカリ性環境中で化学的触媒作用によるか、またはリパーゼを用いる酵素的触媒作用によって、前記グリセリド画分を低級アルコールによりエステル交換する工程；

(d) 得られたアルキルエステル生成物をアルコール中で過剰の尿素と共に55~99℃の温度に加熱する工程；

(e) 工程(d)の生成物を冷却して尿素脂肪酸アルキルエステル付加物を沈殿させ、その後、該付加物を分離除去してn-3脂肪酸エステルを主に含有する溶液を残す工程；

(f) 工程(e)で残した溶液からn-3脂肪酸アルキルエステルを分離する工程；および

(g) 工程(f)で得られた混合物から全ての溶媒を除去する工程；を含む、方法。

11. 前記工程(g)で得られた濃縮物を、1またはそれ以上の工程の分子蒸

留の手段によりさらに濃縮させ、その中に含まれるEPA+DHAの濃度を85重量%またはそれ以上にまで上昇させる、請求項10に記載の方法。

12. 実質的に純粋なEPAならびに実質的に純粋なDHAを得るための、請求項7~9のいずれか1つに記載の方法であって、さらに次の工程：

(i) 実質的に無水である条件下、かつEPAのエステル交換を優先的に触媒するに活性なリパーゼの存在下に、C₁~C₆アルコールにより前記グリセリド画分をエステル交換する工程；

(ii) 得られたEPAに富むC₁~C₆アルコールエステル画分と残余のDHAに富むグリセリド混合物とを分離する工程；

(iii) 上記EPA-C₁~C₆アルコールエステル画分を処理し、そして該EPA画分を実質的に100%の純度にまで濃縮する工程；

(iv) DHAのエステル交換を触媒するに活性なリパーゼの存在下に、 C_1 ～ C_6 アルコールにより上記DHAに富むグリセリド混合物をエステル交換する工程；および

(v) 得られたDHA- C_1 ～ C_6 アルコールエステル画分を処理し、そして該DHA画分を実質的に100%純正なDHAにまで濃縮する工程；を含む、方法。

13. 前記工程(i)におけるリパーゼが、マコール・メイヘイ (Mucor meih ei) のリパーゼである、請求項12に記載の方法。

14. 前記工程(iv)におけるリパーゼが、カンジダ・アンタラクチカ (Candida antarctica) のリパーゼである、請求項12または13に記載の方法。

15. 前記工程(i)および/または(iv)における C_1 ～ C_6 アルコールが、エタノールである、請求項12～14のいずれか1つに記載の方法。

16. 前記油組成物が、n-6多不飽和脂肪酸を含有する植物油または蔬菜油あ

るいは発酵生成物である、請求項1～6のいずれか1つに記載の方法。

17. 前記リパーゼが、アラキドン酸(AA)に対して実質的に不活性なリパーゼである、請求項16に記載の方法。

18. 前記リパーゼが、シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) のリパーゼまたはシュードモナス・フルオレセンス (Pseudomonas fluorescens) のリパーゼである、請求項17に記載の方法。

19. 少なくとも40重量%のアラキドン酸を含有する組成物の調製のための、請求項16～18のいずれか1つに記載の方法であって、さらに次の工程：

(c) アルカリ性環境中で化学的触媒作用によるか、またはリパーゼを用いる酵素的触媒作用によって、前記グリセリド画分を低級アルコールによりエステル交換する工程；

(d) 得られたアルキルエステル生成物をアルコール中で過剰の尿素と共に55～99℃の温度に加熱する工程；

(e) 工程(d)の生成物を冷却して尿素脂肪酸アルキルエステル付加物を沈殿させ、その後、該付加物を分離除去してn-6脂肪酸エステルを主に含有す

る溶液を残す工程；

(f) 工程(e)で残した溶液からn-6脂肪酸アルキルエステルを分離する工程；および

(g) 工程(f)で得られた混合物から全ての溶媒を除去する工程；を含む、方法。

20. 前記工程(g)で得られた濃縮物を、1またはそれ以上の工程の分子蒸留の手段によりさらに濃縮させ、その中に含まれるアラキドン酸の濃度を85重量%またはそれ以上にまで上昇させる、請求項19に記載の方法。

21. 前記アラキドン酸画分が、実質的に100%の純度まで濃縮される、請求項20に記載の方法。

22. トリグリセリドの形態で飽和および不飽和脂肪酸を含有する油組成物からの環境汚染物質の除去のための方法であって、次の工程：

(a) 該油組成物を、実質的に無水の条件下、かつ飽和および単不飽和脂肪酸のエステル交換を優先的に触媒するに活性なリパーゼの存在下に、反応中に存在するC₁~C₆アルコールの量が、存在するトリグリセリドに基づいて15モル当量を超えない量であるC₁~C₆アルコールを用いて、エステル交換反応に供する工程；そしてその後で、

(b) 工程(a)において得られた生成物を1またはそれ以上の分子蒸留に供して多不飽和脂肪酸のグリセリドに富み、かつ環境汚染物質が優先的に除去された残余画分を回収する工程；を含むことを特徴とする、方法。

23. 前記工程(a)が、請求項2~5のいずれか1つに規定のようにして実施される、請求項21に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

精油組成物

本発明は、より高い濃度の多不飽和脂肪酸を有する精製された生成物を得るために、グリセリドの形態で飽和および不飽和脂肪酸を含有する油組成物を処理する新規な方法に関する。本発明は、特に好ましい態様において、魚油組成物中のEPAおよびDHAの濃度を上昇させる方法を提供する。

本明細書において「多不飽和脂肪酸」はオメガーまたは n -数を末端のメチル基から数えて最初の二重結合の位置で命名する方式に従い同定される。例えば、オメガー3または $n-3$ の脂肪酸においては、酸の末端メチル基から第3番目の炭素炭素結合に最初の二重結合が現れる。さらに例えばC18:3として脂肪酸が同定されていれば、これは鎖中に18炭素原子を有し、かつ3つの二重結合を有する脂肪酸を表している。

商業的に重要な多不飽和脂肪酸は、EPA(エイコサペンタエン酸、C20:5)、DHA(ドコサヘキサエン酸、C22:6)およびAA(アラキドン酸、C20:4)である。IUPAC(国際純正および応用化学連合)方式に従ったこれらの酸の完全な名称は、次の通りである。

EPA

シス-5, 8, 11, 14, 17-エイコサペンタエン酸

DHA

シス-4, 7, 10, 13, 16, 19-ドコサヘキサエン酸

AA

シス-5, 8, 11, 14-エイコサテトラエン酸

広く知られているように、EPAおよびDHAは特に医薬産業および食品添加物産業においてその価値が上昇している。これらの酸はある種の海産油(marine oil)中に比較的高濃度で見出されるが、種々の目的のためには、これらの海産油を精製することにより、適切なレベルまでEPAおよび/またはDHAの含有量を増加させるか、あるいは原料油中に生来的に現出するある種の他の物質の濃度を減少させるか、さらにはその物質を排除することが必要である。例えば医薬

および食品に用いることを目的とする場合には、人口密集地域からかなり離れた海洋域において捕獲された魚から得られたものであってさえも海産油中に広く現出する殺虫剤残渣を、実質的に完全に排除する必要がある。

EPAおよびDHAが毒性無しに生物学的活性を発揮するためには、これらはその生来的に現出する状態に相当する完全なシス（Z-Z）立体配置を示していなければならない。しかしながらこれらの酸は、熱せられたときに極端にもろく、そして非常に容易に、急速な低分子量化、異性体化および過酸化反応を受ける。従って、EPAおよびDHAを含有する海産油組成物を、有用な形態をしたそれら所望の酸を損失する危険なしに、精製することは極端に困難である。

EPAおよびDHAは、多くはそのトリグリセリドとして海産油中に現出する。現在までのところ、最も実際的な精製方法は、低分子量アルコール（通常はエタノール）を用いて油をエステル化すること、または油を加水分解して遊離酸またはその塩を形成させることのどちらかから出発し、その後、所望の生成物を回収するための油の分別が開始されている。

しかし、海産原材料の複雑さの故に、高度に精製された形態の多不飽和脂肪酸誘導体は、どのような単一分別技法によっても容易に調製されない。従って、通常は複数の技法の組合せが用いられるが、その際には、原材料の組成、濃度および生成物に求められるその他の品質基準に応じて、特定の組合せが選択される。尿素錯化反応は、高EPAおよび／またはDHA含有量組成物を回収する方法に広く採用されている分別技法の一つである。

尿素は直鎖有機化合物と固体錯体を形成するという有用な特性を有している。脂肪酸またはエステルを含有する海産油組成物が尿素溶液に添加されたときに、酸の、より飽和した画分において、結晶性錯体が形成される。この結晶は、より

不飽和な脂肪酸または脂肪酸エステルのラフィネートから除去され得る。

尿素錯化反応は、両方の遊離脂肪酸、ならびに脂肪酸のメチルまたはエチルエステルに対して用いられている。この技法は、尿素吸蔵形成のためのリアクターとしてキサゲ面を備えた熱交換器を用いて連続的になされることができる。エステルを分別するときには、最初に油をアルコールおよび／またはアルコール／水

と反応させ、次に尿素錯化反応前にエステル/遊離脂肪酸を単離することが普通の手順であると思われる。しかし、その場でのエステル化と尿素分別との組合せも、欧州特許出願第0255824号明細書に記載されているように、実施されることができる。

そのような方法が、例えば2またはそれ以上の工程の分子蒸留と組み合わせて用いられれば、原料海産油由来のEPAおよびDHAが多くを占める $n-3$ 多不飽和脂肪酸を85重量%またはそれ以上含有する精製された生成物を製造することが可能である。しかし、精製された生成物の総回収率はあいにく低い。そのような従来の分別方法を用いた典型的な工業的操業において期待し得るのは、1000トンの原料海産油から約60~80トンの85% $n-3$ 脂肪酸濃縮物だけが回収されること、即ちわずか6~8%の回収率である。この僅かな収率は、そのような精製方法が非常に割高であることのみでなく、それらの方法が大規模で複雑な装置を必要とすることをも意味している。

多くの環境汚染物質（例：殺虫剤および多塩素化ビフェニル）の親油性特質は、これらの化合物の海産脂質中への集積という結果を生む。不運にも、尿素はそのような汚染物質の多くとは錯体を形成せず、その結果、尿素錯化反応により得られる濃縮物は、元の海産油に比べて上昇した、多くの目的には許容され得ないほど高いレベルの殺虫剤およびその他の環境汚染物を含有する。従って、人間が消費するための精製魚油を製造するための、尿素錯化反応に基づく現行の精製方法は、複雑で高価な精製手順を包含して汚染物質レベルを許容され得る値まで減少させる必要がある。

本発明は、油組成物の多不飽和脂肪酸含量を増加させるための改良された方法、特にEPAおよび/またはDHAを増加した収率で魚油から回収するための産業的方法に適合した方法を提供することを目的とする。

公知のように、リパーゼは、EPAおよびDHA等の、海産油中に現出する非常に不安定な $n-3$ 多不飽和脂肪酸を包含する方法における触媒としての使用に好適である。これは、低温で作用し得るリパーゼの能力、その中性pHおよび作用の穏やかさのためであり、これらは、シス-トランス異性体化、二重結合移行

、重合化および酸化等の望ましくない副反応を最小限に留めることを助ける。そして、海産油中の脂肪酸の加水分解のためのリパーゼの利用は既によく文献に記述されている。

例えば、リーとランバートソン (Lie and Lambertsen in Comp. Biochem. Physiol. 80B No. 3, pages 447-450, 1985) は、タラから得られた腸管リパーゼがカラフトシシャモ油中にトリグリセリドとして存在する18:4、20:5および22:6の多不飽和脂肪酸を優先的に加水分解したことを報告している。彼らは、この特異性が20:5の酸、即ちEPAに対して特に顕著であったと報告している。

一方、リーとランバートソンは、カンジダ・シリンドラセア (*Candida cylindracea*) のリパーゼによって、カラフトシシャモから得られたトリグリセリドとしてはC₁₄ ~ C₁₈ の飽和および不飽和脂肪酸が優先的に加水分解されたのに対し、長鎖モノエン類であるC20:1およびC22:1ならびに特に不飽和脂肪酸であるC18:4が、そしてそれより少ない程度でEPAおよびDHAが、加水分解に対して抵抗性であったことも報告している (Lie and Lambertsen, Fette, Seifen, Anstrichmittel, 88, 365, 1986)。

ノグチら (Noguchi et al.) による日本特許59-14793号明細書は、飽和酸と不飽和酸とのリパーゼによる上記と同様の識別に基づく、高度に多不飽和な脂肪酸の濃縮物を調製するための方法を述べている。イワシとサバの油等の寄せ集め海産油からのエチルエステルは、種々のリパーゼ (*Candida cylindracea*、*Aspergillus rhizopus*および*Mucor miehei*のリパーゼ) で加水分解される。選択的加水分解は、加水分解された脂肪酸の分離後に25%までのEPAおよび17%までのDHAのエチルエステル濃縮物をもたらした。

別の日本特許172691号明細書 (日本油脂、1990年) が、カンジダ・エスピー (*Candida sp.*) のリパーゼを用いた海産油の加水分解に基づく方法を

述べている。EPAまたはそのエステルが遊離脂肪酸成分から得られ、そしてDHAまたはそのエステルが残物グリセリド成分から得られた。この方法の操作は、脂肪酸とグリセリド成分の分離、低級アルキルを用いたエステル化、尿素錯化

反応を用いた多不飽和脂肪酸の濃縮、そしてさらに、分子蒸留、超臨界CO₂流体抽出または液体クロマトグラフィーによる精製を包含していた。タカギ (Takagi, Am. Oil Chem. Soc. 66, 488, 1988) は、固定化したマコール・メイヘイ (Mucor meihei) のリパーゼを用いてEPAとDHAを分離するための、リバース法 (reverse process) に基づく方法を述べている。

尿素付加物法により日本産イワシ油から得られた多不飽和脂肪酸濃縮物が、室温でn-ヘキサン媒質中にてメタノールでエステル化された。リパーゼがEPAとDHAとを識別し、そして選択的エステル化が、51%のEPAと6%のDHAを含みEPAに富むメチルエステル濃縮物、ならびに52%のDHAと12%のEPAを含みDHAに富む遊離脂肪酸濃縮物とを、それぞれ59対41の割合でもたらした。

ヤマネ (Yamane) およびその共同研究者らは、つい最近、種々のリパーゼを用いてタラ肝臓油および精製イワシ油を選択的に加水分解している (Agric. Biol. Chem. 54, 1459, 1990)。最良の結果はカンジダ・シリンドラセア (Candida cylindracea) の非位置特異性リパーゼ、およびアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) の1,3-特異性リパーゼにおいて得られたが、グリセリド生成物のEPA含有量を有意に上昇させたリパーゼは無かった。

海産油脂肪酸のエステルを加水分解するためのリパーゼの使用に関するこの先行研究から、次のことが明らかである。即ち、異なるリパーゼが全く異なる挙動をすること、ならびに、ある脂肪酸と別の脂肪酸との間またはあるタイプの脂肪酸と別のタイプの脂肪酸との間での非常に顕著な選択性が、リパーゼによりしばしば発揮されることである。

ある種のリパーゼのこの基質選択性がズイとワードによって利用され、そして彼らは、n-3多不飽和脂肪酸に富む画分を調製するための、タラ肝臓油の、リパーゼで触媒されたアルコールシスについて述べている (Zuyi and Ward, "Lipase-catalyzed alcoholysis to concentrate the n-3 polyunsaturated

fatty acid of cod liver oil", Enzyme Microb. Technol., 1993, 15, July, 601-606)。この著者らは9種類のリパーゼについて研究を行い、そして彼らはシ

ュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) のリパーゼ (Amano International Enzyme CoからのCES) が他のリパーゼよりも高い割合で魚油をアルコールシスし、EPAおよびDHAに非常に富むモノグリセリドを製造したことを見出した。この先行技術の方法において、(エタノールおよびイソプロパノールが使用されたが、) アルコールは、反応体と反応のための溶媒とを兼ねて採用された。

ズイとワードは反応媒質中の水の濃度の効果を研究し、そして彼らはリパーゼCESによる(イソプロパノールを用いた) アルコールシスが0~7.5% (v/v) の範囲内の含水量に連れて増加したことを見出した。公表されたデータは、5% (v/v) の含水量が最適であること、および2.5% (v/v) の含水量では油中に存在する元のトリグリセリドの40%を越えるものが12時間後でも未反応のままであったことを示している(これらの含水量は反応系に添加した水を指しており、魚油および「乾燥」酵素中に不可分に存在する少量の水は除外されているものと理解される)。付随してトリグリセリドから遊離脂肪酸への加水分解が(典型的には30%を越える) 非常に高い割合で生じており、例えば、5% (v/v) の含水量において、(アルコールシスは僅か15.5%であるのに比べて、) 18.9%の加水分解が生じている。

上記のズイとワードの方法は科学的には興味深いものであるが、不運にも、この方法は精製EPA/DHA組成物を工業的に調製するための改良された方法を提供していない。特に、リパーゼにより触媒された生成物中に大量の遊離脂肪酸が不可分に存在することが、その後に所望のn-3多不飽和脂肪酸を精製することを困難にしている。例えば、低い揮発性のために、従来の分子蒸留技法では遊離脂肪酸をグリセリドと分離することができない。さらに、エステルおよび遊離脂肪酸は実質的に異なる極性を有し、そしてモノーおよびジグリセリドはその中間的な極性であるので、抽出法では、これらをグリセリドと分離することができない。下記に示すとおり、これとは対照的に有利に、本発明は分子蒸留を用いて、多不飽和脂肪酸グリセリドを飽和および単不飽和脂肪酸エステルと分離するのみならず、同時に、所望の多不飽和脂肪酸グリセリド画分から殺虫剤および多

塩素化ビフェニル等の環境汚染物質の除去をも行うことができる。

本発明者らは、本発明により、ズイトワードによって使用されたシュードモナス・エスピー (*Pseudomonas* sp.) のリパーゼを含むある種の特定のリパーゼが、実質的に無水の反応条件下に海産油中のトリグリセリド内の飽和および不飽和脂肪酸のエステル成分を選択的にエステル交換することに用いられ得ることを思いがけず見出した。そのようなエステル交換が、実質的に付随する加水分解無しに、変換の程度に応じて、主としてモノーおよびジグリセリドであるがトリグリセリドであってもよい、エステルとしてグリセロール成分に結合したままの残余 $n-3$ 多不飽和長鎖脂肪酸と、より感受性な飽和脂肪酸のモノエステルの混合物をもたらすことが判明した。

より具体的には、本発明は、より高濃度の多不飽和脂肪酸を有する精製された生成物を得るために、トリグリセリドの形態で飽和および不飽和脂肪酸を含有する油組成物を処理する方法であって、次の工程：

(a) 該油組成物を、実質的に無水の条件下、かつ飽和および単不飽和脂肪酸のエステル交換を優先的に触媒するに活性なリパーゼの存在下に、反応中に存在する $C_1 \sim C_6$ アルコールの量が、存在するトリグリセリドに基づいて15モル当量を超えない量である $C_1 \sim C_6$ アルコールを用いて、エステル交換反応に供する工程；そしてその後で、

(b) 多不飽和脂肪酸のグリセリドに富む残余画分を、前記リパーゼで触媒されるエステル交換反応により製造された飽和および単不飽和脂肪酸エステルを含有する画分から分離する工程；
を含む方法を提供する。

既述の通り、本発明の方法は、海産油中で飽和および単不飽和脂肪酸のエステル交換を優先的に触媒するに活性なリパーゼを利用する。本発明者らは、多くのリパーゼが、本発明のエステル交換反応において比較的貧弱な活性を有するかまたは全く活性を有していないか、あるいは飽和および単不飽和脂肪酸を一方としてももう一方を多不飽和脂肪酸とする双方の間で貧弱な選択性を示すかのどちらかであることを見出した。このことは、例えば種々の細菌類のリパーゼ [*Geotrichum candidum* (GCL; Amano GC)、*Aspergillus niger* (ANL; Amano A)、

Candida rugosa (CRL; Amano AY)、Chromobacterium viscosum (CVL; Sigma)、Humicola lanuginosa (HLL; Amano CE)、Rhizopus delemar (RDL; Amano D)、Rhizopus oryzae (ROL; Amano F)、Penicillium camembertii (PCL; Amano G)、Candida lipolytica (CLL; Amano L)、Mucor javanicus (MJL; Amano M)、および Rhizopus niveus (RNL; Amano N) に当てはまる。カンジダ・アンタラクチカのリパーゼ [Candida antarctica (CAL; Novo SP435)] はエステル交換反応において高活性であることが見出されたが、不運なことに脂肪酸の異なるクラスの間での低い選択性を示したかまたは全く選択性を示さなかったので、本発明に用いるには適していない。

本発明者らの見出した、本発明の方法において使用し得るリパーゼの例は、良好なエステル交換活性ならびに多不飽和脂肪酸と飽和および単不飽和脂肪酸との間での適度な選択性を示すマコール・メイヘイ (Mucor meihei) のリパーゼ (MML; Novo Lipozyme); 他のリパーゼよりも活性が低いが双方共に満足すべき選択性を発揮するカンジダ・シリンドラセア (Candida cylindracea) のリパーゼ (CCL; Sigma) およびペニシリウム・ログエフォルティイ (Penicillium roquefortii) のリパーゼ (PRL; Amano R); ならびに、双方共に良好な活性および選択性を発揮するのでしばしば本発明に用いるに好ましいシュードモナス・フルオレセンス (Pseudomonas fluorescens) のリパーゼ (PFL; Amano PS) およびシュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) のリパーゼ (PSL; Amano AK) を包含する。

リパーゼの支持体材料上への固定化は幾つかの利点を提供し得る。例えば、固定化はリパーゼに高い安定性を与えるので、リパーゼがより長く持ちこたえる。また、固定化はリパーゼの回収をかなり容易にし、そしてその再使用を可能とするが、これはコストを劇的に低減する。また、固定化酵素が用いられるとエステル交換反応が扱い易くなり、そしてリパーゼが、やはり酵素的工業化方法にとって極めて重要な、連続法に適するようになる。ときには、固定化は酵素の能力における改善をもたらす。最後に、支持体表面上でのリパーゼの分散はリパーゼの基質への暴露を確実にし、それにより単位重量当たりの酵素活性を劇的に増大させ、そして酵素の投与量および従って酵素に関する費用を大きく削減する。

EPAとDHA双方に富む精製魚油組成物の調製が所望であれば、これらのn-3多不飽和脂肪酸双方に対して実質的に不活性なリパーゼ、即ちEPAとDHAとを有意に識別しないリパーゼを使用することが好ましい。このような場合にはシュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) とシュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) のリパーゼが使用されることが好ましいが、後者のリパーゼが特に好ましい。これらのリパーゼは、アマノ・インターナショナル・エンザイム社 (Amano International Enzyme Co of Nagoya, Japan) から入手可能である。

本発明の方法の重要な特徴は、リパーゼで触媒されるエステル交換が実質的に無水の反応条件下に実施されなければならないことである。好ましくは、反応系内の総水量は、海産油とリパーゼを含む全ての供給源からのものを合わせて1% (w/w) 未満でなければならず、好ましくは0.5 (w/w) 未満であり、そして最も望ましくは0.01~0.25% (w/w) の間である。(典型的な場合において、海産油出発材料は0.1~0.2% (w/w) の水を含有し、アルコール試薬として使用される無水エタノールは0.2~0.5% (w/w) の水を含有し、そしてリパーゼ調製物は2~2.5% (w/w) の水を含有している。)

しかし、少量の水、一般的にはリパーゼの重量に基づいて約1~2重量%が、活性を成立させるためには酵素系内に常に必要とされるので、完全な無水反応条件を採用することは不可能である。必要とする水の量は使用する酵素に非常に大きく依存する(例えばカンジダ・シリンドラセア (*Candida cylindracea*) のリパーゼは本発明の方法において最大の活性を発揮するために約10重量%の水の添加を必要とする)。後記実施例に示すとおり、これらの極少量の水は有意な加水分解を全く引き起こさず、そしてエステル交換された生成物中の遊離脂肪酸の濃度を3重量%未満に維持すること、即ち既述のズイとワードの報告の約10%だけの加水分解率を維持することが可能である。

本発明の別の重要な特徴は、存在するアルコールの量が、存在するトリグリセリドに基づいて15モル当量、好ましくは9モル当量を越えないように制限されなければならないことである(換言すれば、3モル当量のアルコールが化学量論量である)。従って、アルコールは本質的に溶媒としてよりもむしろ反応体とし

て働く。海産油トリグリセリドの、リパーゼで触媒される選択的エステル交換がそのような無溶媒反応系内で成功裏に生じることは驚くべきことである。好ましくは、実質的に化学量論量のアルコール、即ち存在するトリグリセリドに基づいて2～5モル当量のアルコールが採用されるが、それは化学量論量よりも大過剰の量のアルコールが所望の多不飽和脂肪酸の低い回収をもたらすからである。

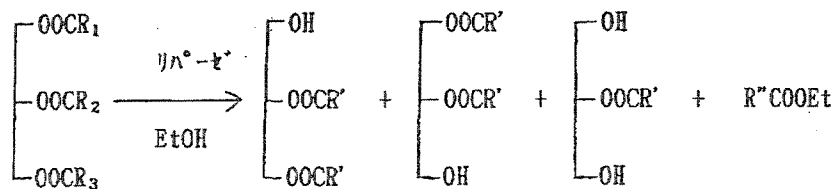
全てのC₁～C₆アルコールを利用可能であるが、(典型的には0.1～0.5重量%の範囲の含水量を有する)無水エタノールの使用が好ましい。入手し易さおよび費用がその理由であり、また実質的に無水な反応条件に留意してのことでもある。

また、エステル交換反応が実施される温度も厳密に制限されるものではない。しかし、温度の増大に連れて反応速度は増大するが反応の選択性は減少する。採用されるリパーゼによるが、一般的に反応は40～60℃を越えない温度で実施されることが好ましく、(約20℃の)室温で実施されることがより好ましい。

エステル交換は、例えば超臨界CO₂のような超臨界液体を反応媒質として用いて実施されることができる。例えば、魚油のエタノリシスは250バール(250×10⁵パスカル)、40℃にて超臨界CO₂中で実施される。超臨界CO₂液体は、反応媒質としてのみならず、エステルと遊離脂肪酸とを残余グリセリドから分離することにも用いられることができる。

本発明による、海産油中のトリグリセリドの、リパーゼで触媒されるエステル交換は、説明のためのC₁～C₆アルコールとしてエタノールを用いた、下記の単純化した反応式により模式的に説明されることができる。

工程(a)



[式中、R₁、R₂、R₃は元の組成物中にトリグリセリドとして存在する、混合した(飽和、単不飽和および多不飽和)脂肪酸を表し、

R'はn-3多不飽和脂肪酸を表し、そして

R”は飽和および単不飽和脂肪酸を表す。]

(単純化のために、1, 2-および2, 3-ジグリセリドおよび2-モノグリセリドだけが生成物側に示されている。)

グリセリド画分からのエチルエステル画分の分離は分子蒸留技法により適切に実施されるが、該技法において、相対的に揮発性のエチルエステルが揮発性に劣る残余グリセリド混合物から容易に除去されることができる。エステル交換反応の生成物は実質的に無水である反応条件の使用の結果として、遊離脂肪酸を少量だけ含有しているので、分子蒸留後には、所望でない飽和および単飽和脂肪酸を実質的に有しない残余画分が得られる。分子蒸留工程は少量の最も揮発性なモノグリセリドを蒸留物中に出現させるという結果を生むことがあるが、これらのモノグリセリドは主として比較的短鎖の脂肪酸のモノグリセリドである(即ち、EPAまたはDHAは蒸留物中に僅かしか失われないか、または全く失われない)。同様に、少量の低揮発性のエステル画分、即ち主としてEPAおよびDHA等の長鎖脂肪酸のエステルが、残余グリセリド混合物と共に残り得る。従って、所望の多不飽和脂肪酸の比較的量の少ない一部がエステル交換にあずかるが、それにもかかわらず、蒸留後の残余画分中に残る。これらのことから、分子蒸留は難しい分離に適しているとは一般的に見なされていないにもかかわらず、本発明の方法においては驚くほど有利であることが証明された。

殺虫剤および多塩素化ビフェニル(PCB類)等の環境汚染物質は長鎖脂肪酸のグリセリドよりも揮発性であるので、分子蒸留はこれらの化合物をグリセリド画分から除去し、そしてこれらの化合物は蒸留物(エステル画分)中に濃縮される。これが、本発明の方法における分子蒸留の使用のさらに別の利点である。

実際、ある特定の態様において、本発明は、トリグリセリドの形態で飽和および不飽和脂肪酸を含有する油組成物からの環境汚染物質の除去のための方法であって、次の工程:

(a) 該油組成物を、実質的に無水の条件下、かつ飽和および単不飽和脂肪酸のエステル交換を優先的に触媒するに活性なリパーゼの存在下に、反応中に存在するC₁~C₆アルコールの量が、存在するトリグリセリドに基づいて15モル

当量を超えない量である $C_1 \sim C_6$ アルコールを用いて、エステル交換反応に供する工程；そしてその後で、

(b) 工程(a)において得られた生成物を1またはそれ以上の分子蒸留に供して多不飽和脂肪酸のグリセリドに富み、かつ環境汚染物質が優先的に除去された残余画分を回収する工程；
を含む方法を提供する。

本発明の方法は、EPAおよびDHAを40重量%を超え、好ましくは70重量%を超える高濃度で含有する組成物の海産供給源からの調製に特に適合している。リパーゼで触媒されるエステル交換の生成物は所望でない飽和および単不飽和脂肪酸を遊離酸としてよりはむしろ主としてそれらのエチルエステル（エチルアルコールが使用された場合）の形態で含有する（多不飽和脂肪酸は実質的にグリセリドとして残る）ので、飽和脂肪酸画分は、所望の多不飽和脂肪酸成分の比較的少ない損失を伴う比較的穏やかな分子蒸留により除去され得る。同時に、殺虫剤およびPCB類等の比較的揮発性の環境汚染物質が、上記で論じたように、エチルエステル画分と共に除去される。EPA/DHA濃縮物を製造するための従来法と比較すると、本発明は、特にその好ましい態様において、下記のような重要な利点をもたらす。即ち、

(i) 溶媒の不存在が嵩高性の非常な減少をもたらし、この効果は化学量論濃度のアルコールだけを使用し得ることにより強調され；

(ii) エステル交換反応が、例えば室温のような穏やかな条件下に実施され得るので、副反応を最小限にし、そして高エネルギーの inputs を必要とせず；

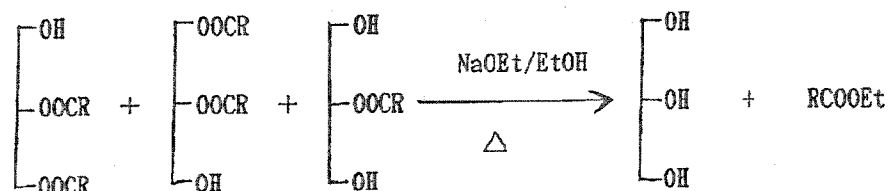
(iii) EPAおよびDHAの回収が非常に高く、そして回収された生成物は環境汚染物質による汚染を本質的に被っておらず；そして

(iv) 用いられる実質的に無水である反応条件は最小限の加水分解をもたらしそれにより、エステル交換反応からのグリセリド画分の分子蒸留が、

所望でない飽和および単不飽和脂肪酸からの所望の多不飽和脂肪酸の良好な分離を与える。

従って、本発明のアルコールシス法は、EPA+DHA濃縮物の製造のための

統合 (integral) 製造方法における最初の段階となり得る。そのような統合方法において、飽和脂肪酸エチルエステル画分の多不飽和脂肪酸グリセリド画分からの分離を実施するための分子蒸留またはその他の技法の後、所望の多不飽和脂肪酸を含有する後者の画分はさらに、存在する特定の酸の濃度を上昇させるために処理されることができる。例えば、高度に濃縮されたEPAおよびDHAを含有するエチルエステル組成物を得ることが所望であれば、分子蒸留後に得られるグリセリド画分は、例えば、触媒量のナトリウムエトキシドまたはカリウムエトキシド等の存在下に無水エタノールを用いた化学的エステル交換によりエステル化されることができる。この方法は、次の反応式により模式的に説明される。



(単純化のために、1, 2-および2, 3-ジグリセリドおよび2-モノグリセリドだけが上記式中に示されている。)

次いで、製造されたグリセロールが公知の技法を用いて除去され得る。典型的には、これは、従来法に比べて非常に良好な多不飽和脂肪酸の回収による、約45～50重量%のEPA+DHA含量をもたらす。

より具体的には、本発明による高濃度EPA+DHA組成物を得るための統合方法は、さらに次の工程：

(c) ナトリウムエトキシドまたはカリウムエトキシド等の塩基をエステル交換を触媒するに十分な量だけ含有するアルカリ性環境のような化学的触媒作用か、または実質的に無水である条件下でカンジダ・アンタラク

チカ (*Candida antarctica*) のリパーゼを用いるような酵素的触媒作用を用いて、グリセリド画分を低級アルコールによりエステル交換する工程；

(d) 得られたアルキルエステル生成物をアルカノール中で過剰の尿素と共に55～99℃の温度に加熱する工程；

(e) 工程(d)の生成物を、例えば0～25℃に冷却して尿素脂肪酸アル

キルエステル付加物を沈殿し、その後、該付加物を分離除去してn-3脂肪酸エステルを主に含有する溶液を残す工程；

(f) 工程(e)で残した溶液からn-3脂肪酸アルキルエステルを分離する工程；および

(g) 工程(f)で得られた混合物から全ての溶媒を除去する工程；を含む。

本発明の統合方法の特に好ましい態様において、工程(g)で得られた濃縮物が、例えば9工程の分子蒸留のような1種類またはそれ以上の手段によりさらに濃縮されて、その中に含まれるEPA+DHA濃度が85重量%またはそれ以上に上昇せられる。

添付の図1は、85重量%EPA+DHAエチルエステル濃縮物の製造のための、本発明によるそのような統合製造方法を模式的に説明している。

例えば触媒量のナトリウムエトキシドまたはカリウムエトキシドの存在下にエタノールを用いて行うような、グリセリド画分の化学的エステル交換の代替として、エステル交換は、例えばカンジダ・アンタラクチカ (*Candida antarctica*) のリパーゼを用いる等、酵素的に実施されることができる。このリパーゼはn-3多不飽和脂肪酸に対して、他の脂肪酸に対すると同様に非常に活性であり、そして採用されたときに、穏やかな条件下かつ溶媒の不存在下に高度に効率的にグリセリド画分のエステル交換を実施することにより、嵩高性のさらなる減少に寄与し得る。

幾つかの例において、出発海産油組成物から実質的に純粋な1種類の不飽和脂肪酸を単離することを所望されることがある。それぞれ実質的に100%のEPAおよび100%のDHAである生成物の製造のためのそのような方法が、添付

図2において模式的に説明されている。本発明のこの態様は、本発明の教示に従い飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との最初の分離を達成するためのシュードモナス属 (*Pseudomonas*) のリパーゼ (PSL) のみならず、その後の工程において、DHAよりもむしろEPAのエステル交換を選択的に好み、それによりこれら2つの酸の良好な分離を可能とするマコール・メイヘイ (*Mucor miehei*) のリパーゼ

(MML)、ならびにそのようにして製造されたDHAに富むグリセリド混合物のエタノリシスを実施するカンジダ・アンタラクチカ (*Candida antarctica*) のリパーゼ (CAL) をも利用する。

さらに具体的には、実質的に純粋なEPAならびに実質的に純粋なDHAを得るための、本発明による好ましい統合方法は、次の工程：

(i) 出発海産油を上記の通り実質的に無水である反応条件下にPSLを用いてエタノールによりエステル交換する工程；

(ii) リパーゼにより触媒されたエステル交換生成物を分子蒸留に供して40～50%のEPA+DHAを含有するグリセリド画分を回収する工程；

(iii) 工程(ii)からのグリセリド画分を最初のエステル交換と類似のエステル交換条件（即ち実質的に溶媒および水の不存在、かつ実質的に化学量論量のエタノールの使用）下にマコール・メイヘイ (*Mucor meihei*) のリパーゼ (MML) を用いてエタノールによりエステル交換する工程；

(iv) 得られたEPAに富む画分と残余のDHAに富むグリセリド混合物とを工程(ii)と類似の方式にて分子蒸留により分離する工程；

(v) EPA-エチルエステル画分を、分子蒸留を尿素沈殿、クロマトグラフィー等と組み合わせて用いること等により処理して実質的に100%純度までEPA画分を濃縮する工程；

(vi) 工程(iii)より回収したMML介在エステル交換からのDHAに富むグリセリド混合物をカンジダ・アンタラクチカ (*Candida antarctica*) のリパーゼ (CAL) を用いてエタノールによりエステル交換する工程；および

(vii) 得られたDHAエチルエステル濃縮物を工程(v)で用いたと同様の技法により処理して実質的に100%純粋なDHAを回収する工程；を含む。

高濃度のEPAおよび／またはDHAを有する組成物の製造のための統合方法に用いるようにうまく適合され得ることは本発明の特別の利点であるが、同様の一般的技法が、例えば18:4 n-3、20:4 n-3、21:5 n-3および22:5 n-3等のその他の不飽和脂肪酸を海産油から単離することに利

用し得ることも着目されるべきである。本発明の方法は、例えば発酵生成物ならびに蔬菜および植物油等の他の供給源からの、多不飽和脂肪酸含有油生成物に適用可能である。n-6 多不飽和脂肪酸は植物および蔬菜油の特質である。そのようなn-6 脂肪酸は、アラキドン酸(AA、20:4 n-6)、ビスホモγ-リノレン酸(BHGLA、20:3 n-6) およびγ-リノレン酸(GLA、18:3 n-6) を包含する。アラキドン酸を含有する油生成物も、クサレカビ属 (*Mortierella*) を用いた発酵により工業的に得られている。

本発明の方法により、少なくとも40重量%のアラキドン酸を含有する組成物を植物または蔬菜油から容易に調製し得ることが見出された。その方法に用いるに好ましいリパーゼは、シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) のリパーゼおよびシュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) のリパーゼである。アラキドン酸画分は実質的に100%の純度までさらに濃縮されることができる。

一般的に、本発明の方法において出発材料として用いられる海産油組成物は、魚またはその他の海産供給源からの、そしてトリグリセリドの形態で多不飽和脂肪酸を包含する脂肪酸を含有する、未処理のまたは部分的に処理された油であれば、どのようなものであっても良い。典型的には、そのような海産油中のそれぞれのトリグリセリド分子は、種々の程度に、飽和、単不飽和または多不飽和であるか、あるいは長鎖または短鎖の、異なる脂肪酸エステル成分を含有する。

下記実施例により本発明が説明される。

実施例 1

本研究の目的は、多不飽和脂肪酸、特にEPAおよびDHAを、魚油組成物中の飽和および単不飽和脂肪酸から分離するための方法における種々のリパーゼの使用を試験することであった。

下記のリパーゼを試験した：

名前	略号	状態	供給業者
マコル・メイハイ(<u>Mucor meihei</u>)	MML	固定化	ノボ(Novo)
カンジダ・アンタラクチカ(<u>Candida antarctica</u>)	CAL	固定化	ノボ(Novo)
カンジダ・シリンドラセア(<u>Candida cylindracea</u>)	CCL	粉末	シグマ(Sigma)
シュードモナス・フルオレセンス(<u>Pseudomonas fluorescens</u>)	PFL	粉末	アマノ(Amano)
ペニシリウム・ログエフォर्टイ(<u>Penicillium roquefortii</u>)	PRL	粉末	アマノ(Amano)
シュードモナス・イスビ-(<u>Pseudomonas sp.</u>)	PSL	粉末	アマノ(Amano)

1つの試験において、上記リパーゼのそれぞれを37℃で試験し、その結果を表Iに示した。別の試験においては、2種類のシュードモナス属(Pseudomonas)のリパーゼであるPFLとPSLを20℃で試験し、その結果を表IIおよびIIIに示した。

試験に使用した手順は次の通りである：

魚油のトリグリセリドをプロノバ・バイオケア社(Pronova Biocare a.s., Norway)から調達したが、それは14.9%のEPAと9.8%のDHAを含有していた。これらは、さらなる処理をすることなく調達したままで直接使用した。全ての溶媒は分析品質のものをメルク社(Merck AG in Germany)から購入した。特に断らない限り、化学量論量、即ちトリグリセリドに基づいて3モル当量の(無水)エタノールを使用した。カンジダ・シリンドラセア(Candida cylindracea)のリパーゼを用いた場合以外は、反応系に水は全く添加しなかった。魚油出発材料およびリパーゼから生じる水の含量を約0.3~0.4重量%と計算した。カンジダ・シリンドラセア(Candida cylindracea)のリパーゼを用いた場合には、リパーゼの重量に基づき10重量%の量で水を添加し、結果とし

て総量で約0.8重量%の水を含有する反応系とし、この場合でさえも実質的に無水である条件を維持した。

脂肪酸の分析は、既に記載のある手順(G.G. Haraldsson and Ö. Almarsson,

Acta Chemica Scandinavia, 1991, 45, 723-730)に従い、キャリアガスとして水素ガスを用いた30mの細管カラムDB-225 30N 0.25mmを使用するパーキン-エルマー8140ガスクロマトグラフを採用して、エチルエステ

ルについて実施した。それぞれPSLとPFLに関する表IIとIIIに示した詳細な研究のために、分取薄膜クロマトグラフィーを採用し、適当な時間間隔で脂質画分を反応混合物から分離して反応の進行を監視した。メルク社からのシリカゲルプレート (Art 5721) を、クロロホルム-メタノールの50:50混合液で洗浄し、110℃に30分間加熱した後に用いた。溶離は、石油エーテル-ジエチルエーテル-酢酸の80:20:1混合液を用いて実施した。ローダミン(Rhodamine) 6 G (Merck社) を用いてバンドを視覚化し、続いてこれをこそげ取って上記の通り脂肪をメチル化して分析した。注入前に、内部標準としてシグマ社(Sigma) から購入したC₁₉:0またはC_{21:0} のメチルエステルを試料に添加した。

表Iに示した研究において、エチルエステルとグリセリドの分離は、ウオータースプレッパエル [Waters PrepL(商標)] システム500A装置を用いて実施した。ミリポア社 (Millipore) からのプレッパック [PrepPak(商標)] 500/シリカカートリッジカラムを、石油エーテル中の10%エチルエーテルを流速250 mL/分で用いて溶離した。それぞれの試行が屈折検出器の指数により2つのピークを与えたが、第1のピークは、ほぼ1つのカラム容量後に出現し、純粋なエチルエステルからなっており、そして第2のピークは、大ざっぱに、TLCによる純粋なトリグリセリドを含有する2つのカラム容量後に溶離した。残ったモノおよびジグリセリドはメタノールによりカラムから洗い流した。

典型的な手順において、リパーゼ (0.5 g) を、魚油 [5.0 g、約5.67ミリモル (分子量約882 g/モル)] と無水エタノール (0.80 g、17.4ミリモル) の混合物に添加した。得られた酵素懸濁液を窒素雰囲気下に室温 (表Iの研究においては37℃) で穏やかに攪拌した。適当な時間をおいた後、クロロホルムの添加および濾過による酵素の分離により反応を止めた。有機溶媒を真空

下 (回転蒸留器および高真空ポンプ処理) に除去して定量的収量で粗生成物混合物を得た。生成物を等量のクロロホルムに溶解し、上記の通りHPLC装置に注入した。それぞれの画分を収集して溶媒を真空下に蒸留し、計量し、そして最後にガスクロマトグラフィーにて分析した。

分取HPLCの代わりに分取TLCを用いた場合には、適当なときにパスツールピペットを用いて少量（100～200mg）の試料を反応系から取り出した。試料を第2のパスツールピペット内に設置した綿羊毛栓に通すことにより、酵素粒子を分離した。次いで、TLCプレートに導入する前に、それぞれの試料をクロロホルムに希釈した（250mg/mL）。

結果を、下記表I～IIIに示す：

最初の表である表Iは、試験したリパーゼ全てを用いて37℃で（3モル当量のエタノールを用いて）実施された研究の結果を要約している。

表 I

MML (10%, 23時間)		EPA		DHA	
画分	重量%	組成物%	回収%	組成物%	回収%
EE	32.0	8.73	18.66	0.96	3.13
TG	35.0	20.12	47.04	11.49	41.14
MG/DG	32.0	16.07	34.35	17.01	55.70
MG/DG/TG	67.0	18.19	81.39	14.12	96.84

CAL (2%, 10時間)		EPA		DHA	
画分	重量%	組成物%	回収%	組成物%	回収%
EE	47.3	18.51	54.51	4.33	20.36
TG	33.8	15.56	32.74	12.45	41.84
MG/DG	18.9	10.83	12.74	20.11	37.79
MG/DG/TG	52.7	13.86	45.49	15.20	79.64

CAL(2%★、23時間)		EPA		DHA	
画分	重量%	組成物%	回収%	組成物%	回収%
EE	69.5	17.28	76.45	6.77	44.11
TG	16.6	13.16	13.91	14.73	22.92
MG/DG	13.9	10.90	9.64	25.30	32.97
MG/DG/TG	30.5	12.13	23.55	19.55	55.89

CCL(10%★、71時間)		EPA		DHA	
画分	重量%	組成物%	回収%	組成物%	回収%
EE	5	6.52	2.17	2.73	1.45
TG	69	16.19	74.53	10.81	79.00
MG/DG	26	13.43	23.30	7.1	19.55
MG/DG/TG	95	15.43	97.83	9.73	98.55

PRL(10%★、102時間)		EPA		DHA	
画分	重量%	組成物%	回収%	組成物%	回収%
EE	8.4	7.70	4.12	2.48	2.14
TG	61	17.08	66.37	10.53	65.90
MG/DG	30.6	15.14	29.51	10.18	31.96
MG/DG/TG	91.6	16.43	95.88	10.41	97.86

PSL(10%★、5時間)		EPA		DHA	
画分	重量%	組成物%	回収%	組成物%	回収%
EE	40.3	2.42	6.00	2.92	11.70
TG	11.5	30.87	21.84	13.53	15.47
MG/DG	48.2	24.34	72.16	15.20	72.83
MG/DG/TG	59.7	25.60	94.00	14.88	88.30

PFL(10%★、10時間)		EPA		DHA	
画分	重量%	組成物%	回収%	組成物%	回収%
EE	36	2.87	6.44	2.39	8.48
TG	17.7	28.23	31.13	11.41	19.90
MG/DG	46	21.78	62.43	15.8	71.62
MG/DG/TG	63.7	23.57	93.56	14.58	91.52

★ %はトリグリセリドの重量に基づくリパーゼの投与量に関する。

カンジダ・シリンドラセア (*Candida cylindracea*) のリパーゼ (CCL) についての結果は、このリパーゼが水の添加無しには不活性であるので、リパーゼに基づき10%の添加水を用いて得られたものである。カンジダ・アンタラクチ

カ (*Candida antarctica*) のリパーゼ(CAL)のEPAとDHAに対する貧弱な選択性が記録されたので、このリパーゼは本発明において有用では無い。対称的に、試験したその他のリパーゼは全て満足すべき活性および選択性を示し、そして2種類のシュードモナス属 (*Pseudomonas*) のリパーゼはそれらの点において抜きん出ている。

表 II

20℃で3モル当量のエタノールを用いたPSL

脂質クラスの重量%

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	13時間	24時間
MG	5.0	9.4	13.0	17.9	16.8	15.9
DG	29.1	35.6	31.6	23.3	24.9	25.9
FFA	2.6	2.9	2.5	2.7	2.7	2.7
TG	42.9	17.9	14.2	9.1	7.5	3.7
EE	20.4	34.2	38.7	47.0	48.1	51.8

面積%EPA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	13時間	24時間
MG	12.0	12.8	16.4	19.2	22.5	26.1
DG	19.3	21.6	26.0	28.1	32.3	32.3
FFA	3.3	2.7	5.0	6.2	5.7	9.0
TG	19.2	23.2	30.3	31.8	32.7	32.0
EE	1.1	1.2	1.6	2.0	2.2	2.8
MG/DG/TG	18.8	20.7	24.9	25.6	29.0	30.1

面積%DHA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	13時間	24時間
MG	15.5	16.2	16.4	17.3	18.4	17.7
DG	12.7	13.2	13.7	14.1	15.1	14.9
FFA	2.5	2.7	4.9	6.4	6.7	9.9
TG	9.8	10.3	11.6	12.2	12.9	12.3
EE	1.5	1.4	1.9	2.4	2.8	3.6
MG/DG/TG	11.3	12.8	13.8	14.9	15.9	15.7

面積%EPA+DHA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	13時間	24時間
MG	27.5	29.0	32.8	36.5	40.9	43.8
DG	32.0	34.8	39.7	42.2	47.4	47.2
FFA	5.5	5.4	9.9	12.6	12.4	18.9
TG	29.0	33.5	41.9	44.0	45.6	44.3
EE	2.6	2.6	3.5	4.4	5.0	6.4
MG/DG/TG	30.0	33.6	38.7	40.5	44.9	45.8

重量%EPA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	13時間	24時間
MG	3.5	7.8	12.1	21.4	21.8	22.4
DG	37.2	56.5	53.5	51.3	53.1	51.7
FFA	0.6	0.7	0.9	1.2	1.2	1.6
TG	57.3	32.2	29.4	20.3	17.0	15.4
EE	1.5	2.9	4.1	5.7	6.9	9.0
MG/DG/TG	98.0	96.5	95.0	93.0	91.9	89.5

重量%DHA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	13時間	24時間
MG	7.5	15.6	22.8	33.0	29.9	26.2
DG	40.4	55.0	48.3	38.6	41.5	41.0
FFA	0.8	1.1	1.5	2.2	2.3	3.0
TG	48.1	22.6	19.4	13.8	11.4	10.3
EE	3.3	5.7	8.0	12.4	14.8	19.6
MG/DG/TG	96.0	93.2	90.5	85.4	82.8	77.5

上記表IIは、エステル交換における優れた結果がシュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) のリパーゼを用いて得られたことを明示している。即ち、13時間後に48%の変換に達し、91.9%のEPAの回収と82.8%のDHA

の回収を伴う、グリセリド中の44.9%のEPA+DHA含量をもたらした。

24時間の反応後には、52%の変換が得られ、EPAとDHAそれぞれについて89.5と77.5%の回収を伴う、45.8%のEPA+DHA含量をもたらしたが、このことは、実施に当たっては、反応をこれより早い段階で止めることが好ましいであろうことを示唆している。副反応である加水分解の程度は、反応を通じ、2.5～2.9%の範囲内に、定常的に低く維持された。

表 III

20℃で3モル当量のエタノールを用いたPFL

脂質クラスの重量%

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	14時間	25時間	49時間
MG	2.2	2.9	4.8	10.2	15.1	18.1	16.7
DG	10.8	15.6	23.4	34.8	29.2	22.5	16.0
FFA	0.9	0.9	1.3	1.2	1.2	1.0	1.4
TG	81.9	71.0	49.1	27.3	15.8	9.9	6.3
EE	4.2	9.6	21.3	26.5	38.7	48.4	59.7

面積%EPA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	14時間	25時間	49時間
MG	11.6	12.7	13.7	12.7	14.5	16.9	21.5
DG	17.9	19.6	16.9	17.8	25.5	28.9	27.1
FFA	3.5	4.5	6.3	5.1	5.5	8.8	14.2
TG	15.9	16.4	18.0	22.0	29.2	31.8	26.7
EE	0.0	1.5	1.3	1.9	2.2	3.1	4.7
MG/DG/TG	16.0	16.8	17.4	18.7	23.7	25.2	24.6

面積%DHA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	14時間	25時間	49時間
MG	10.5	14.7	18.1	18.1	18.6	18.7	13.2
DG	12.2	12.9	13.5	10.9	13.8	14.4	11.8
FFA	3.4	3.5	4.3	4.4	3.2	9.4	8.4
TG	9.6	9.6	9.3	9.8	10.8	11.4	10.1
EE	0.0	1.3	1.1	1.5	2.0	2.7	3.7
MG/DG/TG	9.9	10.3	11.1	11.5	14.2	15.4	12.1

面積%EPA+DHA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	14時間	25時間	49時間
MG	22.1	27.4	31.8	30.8	33.1	35.6	34.7
DG	30.1	32.5	30.4	28.7	39.3	43.3	38.9
FFA	6.9	8.0	10.6	9.5	8.7	18.2	22.6
TG	25.5	26.0	27.3	31.8	40.0	43.2	36.8
EE	0.0	2.8	2.4	3.4	4.2	5.8	8.4
MG/DG/TG	25.9	27.2	28.5	30.2	37.9	40.5	36.8

重量%EPA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	14時間	25時間	49時間
MG	1.4	2.0	4.1	8.0	12.7	18.8	25.5
DG	12.1	19.4	28.0	43.6	49.2	46.1	35.3
FFA	0.2	0.3	0.6	0.5	0.5	0.7	1.7
TG	86.3	77.5	65.4	44.4	32.2	23.7	14.4
EE	0.0	0.9	1.9	3.5	5.5	10.6	23.0
MG/DG/TG	99.8	98.9	97.5	96.0	94.1	88.6	75.2

重量%DHA

クラス	1時間	2時間	4時間	8時間	14時間	25時間	49時間
MG	2.0	3.8	8.5	18.5	27.1	33.7	28.1
DG	13.3	20.7	35.1	44.0	44.3	36.9	27.6
FFA	0.4	0.4	0.7	0.7	0.4	1.2	1.8
TG	84.3	73.9	53.2	32.5	19.9	13.5	9.8
EE	0.0	1.3	2.5	4.4	8.2	14.7	32.6
MG/DG/TG	99.6	98.4	96.8	95.0	91.3	84.1	65.5

上記表IIIは、シュードモナス・フルオレセンス (*Pseudomonas fluorescens*) のリパーゼにおいてもエステル交換における良好な結果が得られたが、その変換速度はPSLを用いたよりもやや遅いことを示している。即ち、25時間後に、

48%の変換が得られ、それは49時間後に60%まで上昇した。反対に、加水分解の程度はやや低かった。また、このリパーゼの能力は、25時間後における、EPAとDHAの回収（それぞれ88.6%と84.1%）およびEPA+DHA組成物（40.5%）に関して、シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) のリパーゼの能力よりも劣っている。

上記表I～IIIにおいて、下記略号を使用している：

MG モノグリセリド

DG ジグリセリド

TG トリグリセリド

FFA 遊離脂肪酸

EE エチルエステル

面積%EPA、面積%DHAおよび面積%EPA+DHA

面積%は対応するGCクロマトグラムの積分に基づいている。

これらの略号は、後記実施例を通じて使用する。

上記表から、シュードモナス属 (Pseudomonas) のリパーゼは双方共にEPAとDHAに対する独特の低い親和性を示すが、初期のトリグリセリド類に対しては高い親和性を示すことが明らかである。

また、2つのシュードモナス属 (Pseudomonas) のリパーゼは、EPAよりはむしろDHAのエステル交換を幾らか好む傾向があることにも注意すべきであろう。本発明者らが試験した他のリパーゼは全て逆の傾向を示すので、これは全く普通でない振る舞いである。

さらに、表IIおよびIIIから、一定時間後にMG/DG/TGの割合が最高値から減少し始めることにも着目すべきであろう。このことから、一般的に、エステル交換はそれが完了する前に終了することが好ましい。

実施例 2

本研究は、大規模な試行において2種類のシュードモナス属 (Pseudomonas) のリパーゼを試験するために計画した。

実施例 2a - PSL

シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) のリパーゼ (100 g、25200 活性単位/g) を魚油 (1000 g、約 1.13 モル) と無水エタノール (170 g、3.70 モル) の混合物に添加した。得られた酵素懸濁液を窒素雰囲気下に室温で磁力攪拌器で穏やかに攪拌した。反応混合液の含水量を約 0.3 ~ 0.4 重量% であると計算した。

25 時間後、実施例 1 に記載の手順に従い試料を取り出し、分析した。反応はさらに 24 時間続行させた。反応混合液とリパーゼとを分離するため (5000 rpm で 10 分間の) 遠心を採用した。

50 時間後に反応を停止した時点で、生成物は下記の組成を有していた：

表 IV

50 時間		EPA		DHA		EPA+DHA
脂質クラス	重量%	面積%	重量%	面積%	重量%	面積%
MG	17.1	17.0	18.0	17.8	28.9	34.8
DG	26.0	28.9	53.1	14.5	42.1	43.4
FFA	2.8	5.7	1.2	6.0	1.9	11.7
TG	8.9	28.8	19.3	11.8	12.2	40.6
EE	46.2	2.6	8.4	2.9	14.8	5.5
MG/DG/TG	52.0	25.0	90.4	15.1	83.2	40.1

生成物の一部 (902.4 g) を真空下に 80℃ で脱気して揮発性成分を除去した。揮発性成分を液体窒素で冷却したコールドトラップ内に収集した。脱気後

844.1 g のグリセリド/エチル/エステル混合物が残った。この混合物を 756.3 g 取り、125℃、0.005 ミリバール (0.05 パスカル) にて分子蒸留用蒸留器内で蒸留した。これにより 358.6 g (47.4%) の蒸留物と 388.3 g (51.3%) の重さの残物を得た。それぞれの画分は下記の組成を有していた。

表 V

	TG A%	DG A%	MG A%	EE A%	EPA A%	DHA A%	EPA+DHA A%
脱気後	11.2	35.5	19.7	33.6	16.4	11.0	27.4
蒸留物	—	0.9	10.6	88.5	3.6	3.4	7.0
残物	18.5	54.0	25.2	2.3	29.1	18.2	47.3

上記表Vは、残物が47.3%のEPA+DHAを含有していること、即ち分子蒸留前よりも高濃度にこれら所望のn-3多不飽和脂肪酸を含有していることを示している(表IV参照)。これは、さらなる濃縮のためには、公知技法を用いること、即ち分子蒸留の後に尿素画分法を用いることが理想的であることを意味している。

蒸留物がかなりの量のモノグリセリド(10.6%)を含有している一方、残物は2.3%のエチルエーテルを含有していることに着目すべきである。既に論じたように、これらはそれぞれ、比較的単鎖の脂肪酸由来のモノグリセリドと長鎖脂肪酸由来のエチルエステルがほとんどであろう。

実施例 2 b

実施例2aで用いたと同じ油を1kg用意し、これをPFL酵素を用いてエタノールによりエステル交換した。反応は48時間後に停止させた。中間生成物の組成を下記表VIに示す。

表 VI

48時間		EPA		DHA		EPA+DHA
脂質クラス	重量%	面積%	重量%	面積%	重量%	面積%
MG	16.2	14.3	14.0	16.4	27.3	30.7
DG	26.8	26.5	48.6	13.7	43.1	40.2
TG	14.9	26.3	28.3	9.0	17.9	36.2
EE	42.2	2.9	9.9	2.4	11.6	5.3
MG/DG/TG	57.9	23.0	90.9	13.5	88.3	36.5

中間生成物を脱気し、実施例2aと同様の条件下に分子蒸留した。その結果を下記に表として示す。

	TG A%	DG A%	MG A%	EE A%	EPA A%	DHA A%	EPA+DHA A%
脱気後	15.8	31.4	20.1	32.8	15.9	10.0	25.9
蒸留物	—	—	13.7	86.3	4.2	2.9	7.1
残物	25.7	48.8	23.5	2.0	27.8	18.1	45.9

実施例 3

実施例2のそれと類似の3つのパイロットプラント試行から得られた生成物を分析して環境汚染物質のレベルを測定した。その結果を下記表VIIに示す：

表 VII

3つの例からの結果 (mg/kg)：

	α -BCH	HCB	総DDT	トキサフェン
出発材料	nd	nd	0.03	nd
PSLグリセリド	nd	nd	nd	nd
生成物				
PSLエチルエステル	nd	0.01	0.03	nd
副産物				
PFL #1グリセリド	nd	nd	nd	nd
生成物				
PFL #1エチルエステル	0.005	0.02	0.03	0.4
副産物				
PFL #2グリセリド	nd	nd	nd	nd
生成物				
PFL #2エチルエステル	nd	0.03	0.03	0.4
副産物				

nd = 検出されず

HCH = ヘキサクロロシクロヘキサン

HCB = ヘキサクロロベンゼン

DDT = ジクロロジフェニルトリクロロエタン

上記の結果は、汚染物質がエチルエステル画分内に濃縮されることを示している。幾つかの殺虫剤については、出発材料中のレベルが明らかに適用した分析法の検出限界を僅かに下回っていた。これが、本発明者らがこれらの殺虫剤をエチルエステル画分内では検出したが、元の魚油内では検出しなかったことの原因で

ある。奇妙なことに、DDTのレベルは、元の油と比較してエチルエステル画分中で上昇しているようには見えない。本発明者らはエチルエステルとグリセリドを（分子蒸留により）分離する前に、穏やかな分子蒸留工程を実施して反応混合物中の未反応エタノールを除去した。明らかにこのエタノール除去がDDTの一部を除去するに充分であった。回収したエタノールの分析（PSLの実施例）は0.03mg/kgの総DDT量を示したが、一方その他の殺虫剤は検出されなかった。

実施例 4

本研究の目的は、固定化リパーゼのための異なる手法を比較すること、ならびに本発明の方法においてリパーゼを固定化した形態で使用する効果を調べることであった。

A. 固定化手法

(i) デュオライト上へのPSLとPFLの固定化

デュオライト (Duolite) A 562 (Duolite International; 10.0 g) を、ブフナー漏斗上で3~4回、30mMのNaOH（各250mL）を用いて洗浄した後、水（40mL）および磁石攪拌子と共に150mL容ビーカー内に置いた。この溶液のpHを、自動滴定器（1.00M NaOH）を用いてpH8に調整した。最初のpHがpH5.0よりも低いときには、pH8.0で平衡に達するまでに多大な時間を要する可能性がある。一方、pHがpH8以上であるときには、リパーゼ溶液を添加するまで滴定しない。水（20mL）に溶解したリパーゼ（2.0 g、PSL/PFL）をパスツールピペットを介してデュオライト溶液に添加した。自動滴定器を用いて、添加する間中、pHをpH8.0~8.4の間に維持し、そして溶液を1時間磁力攪拌器を用いて攪拌した。その後では、95~99%のリパーゼがデュオライト上に固定化されていた。攪拌後、リパーゼ調製物を緩衝溶液（トリス塩酸；pH8.0）で洗浄した。最後に、固定化リパーゼ調製物を、真空（0.1~0.01mmHg）下に0.5~1時間かけて乾燥した。乾燥過程を速めるために蒸気浴（40℃）を使用することができる。固定化リパーゼ調製物は冷蔵庫（4℃）内に保存した。

(ii) アンバーライト上へのPSLの固定化

アンバーライト (Amberlite) XAD-7樹脂 (50 g ; Rohm and Haas ; 含水量70%) をpH7、0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液で完全に洗浄 (各125 mLで2回) した。PSL粉末 (Amano AK ; 1.5 g ; 20,000リパーゼ単位(LU、トリブチリン加水分解に基づき1分間の間に生成される遊離脂肪酸の μ モルとして規定) ; 17 LU/mg) を、pH7.0で0.1Mのリン酸ナトリウム緩衝液 (200 mL) に溶解した。pHの低下が生じたときにはpHを7.0に調整した。次いで、リパーゼ溶液を樹脂に添加し、そして得られた懸濁液を、トリブチリン加水分解による上澄み液の活性計測により確かめて、少なくとも95%の固定化が起こるまで (約1時間) 攪拌した。

(iii) 固定化リパーゼ調製物の活性計測

固定化樹脂 (約40 mg) を正確に計り取り、n-ブチルパルミテート (310~315 mg) に添加した。この混合物に95%エタノール (120 μ L) を添加し、そして混合物を90分間良く攪拌した。試料を収集し、GLCにより分析した。リパーゼアルコール単位 (LAU) は、1分間の間に生成されるパルミテートの量 (μ モル) として規定されている。

B. 固定化PSLを用いた生産性研究

デュオライトおよびアンバーライトの双方の上に固定化したPSLについて、魚油エタノリシス生産性研究を、次の方法に従い実施した。

(i) 固定化PSLを用いた生産性研究

魚油 (100 g)、無水エタノール (20 mL) および水 (1 mL) を全て混合し、得られた混合物を、良好な分散系が形成されるまで強く攪拌した。湿分を含まない固定化リパーゼ (10 g) をこの分散系に添加し、透明な溶液が形成されるまで強くかき混ぜた。次いで、混合物を、約50%の変換が達成されるまで (24時間) 穏やかに攪拌した。リパーゼを濾過して分離してその後の試行に使用し、その一方で、前述のようにして脂肪を分析した。

デュオライト上に固定化したPSLを用いた生産性研究の結果を下記表VIIIに示す。

表 VIII
デュオライト上のPSLを用いた生産性研究

クラス	試行									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
脂質クラスの重量%										
EE	46.1	51.0	51.7	49.2	46.9	55.4	53.7	54.9	48.3	48.9
FFA	4.5	4.4	5.0	4.1	5.6	2.5	2.3	3.0	3.6	4.4
MG	15.9	16.8	17.3	16.5	17.0	16.5	14.7	13.5	16.7	14.6
DG	26.3	22.8	21.3	25.2	25.1	23.7	27.4	26.1	25.5	25.9
TG	7.3	5.1	4.7	5.0	5.5	1.8	1.9	2.5	5.9	6.2
MG/DG/TG	49.5	44.7	43.3	46.7	47.6	42.0	44.0	42.1	48.1	46.7
面積%EPA										
EE	1.6	1.9	1.9	1.8	1.8	1.7	1.9	1.6	1.4	1.4
FFA	7.6	8.9	9.8	6.8	6.9	11.2	11.8	11.1	8.2	7.7
MG	26.5	26.5	25.1	23.7	22.9	22.4	19.5	17.4	20.9	21.6
DG	42.0	37.6	37.1	35.3	35.7	35.1	36.7	34.2	36.3	38.7
TG	41.0	35.8	35.2	35.6	42.7	29.1	31.7	34.8	44.4	42.6
MG/DG/TG	36.9	33.2	32.1	31.2	31.9	29.9	30.7	30.0	32.0	33.9
面積%DHA										
EE	1.9	2.3	2.3	2.2	2.1	1.9	2.2	1.8	1.5	1.6
FFA	9.3	10.8	9.8	8.1	18.4	18.8	20.6	21.5	9.0	7.7
MG	20.2	20.0	19.8	18.0	18.5	15.4	16.3	14.9	17.6	18.9
DG	17.5	15.6	15.0	14.6	14.5	13.2	15.0	14.1	15.1	16.1
TG	15.5	12.5	13.2	12.7	13.9	9.8	10.7	11.7	14.2	14.0
MG/DG/TG	18.1	16.9	16.7	15.6	15.9	13.9	15.3	14.2	15.9	16.7
面積%EPA+DHA										
EE	3.5	4.2	4.2	4.0	3.9	3.6	4.1	3.4	2.9	3.0
FFA	16.9	19.7	19.6	14.9	25.3	30.0	32.4	32.6	17.2	15.4
MG	46.7	46.5	44.8	41.7	41.4	37.8	35.7	32.1	38.5	40.5
DG	59.6	53.2	52.1	49.8	50.2	48.3	51.7	48.3	51.4	54.7
TG	56.5	48.4	48.3	48.3	56.5	38.9	42.4	46.6	58.7	56.6
MG/DG/TG	55.0	50.1	48.8	46.8	47.8	43.8	45.8	44.2	47.9	50.6
重量%EPA										
EE	3.8	6.1	6.4	5.7	5.1	7.1	7.0	6.8	4.1	4.1
FFA	2.0	2.7	3.6	2.0	2.6	2.3	2.1	2.8	2.0	2.2
MG	19.1	24.3	25.0	21.9	20.8	23.9	17.0	15.3	18.7	16.4
DG	57.9	54.3	52.8	57.7	55.5	62.4	69.3	67.9	57.4	60.0
TG	17.1	12.6	12.2	12.7	16.0	4.4	4.6	7.3	17.7	17.4
MG/DG/TG	94.2	91.2	90.0	92.3	92.3	90.6	90.9	90.5	93.8	93.7
重量%DHA										
EE	8.7	13.2	14.1	12.7	10.6	15.0	14.4	13.1	8.8	8.9
FFA	4.7	5.9	6.3	4.4	12.1	7.3	6.5	9.6	4.2	4.2
MG	27.9	32.7	34.2	30.7	29.1	30.7	25.4	23.4	30.3	27.7
DG	46.4	40.3	37.5	43.8	39.2	44.2	50.9	49.7	45.7	48.1
TG	12.4	7.9	8.0	8.4	9.0	2.8	2.8	4.4	10.9	11.1
MG/DG/TG	86.7	80.8	79.6	82.9	77.3	77.7	79.2	77.4	87.0	86.8

表VIIIは、10回の連続試行において常に高い割合の変換（46～55%）が得られ、これにより固定化リパーゼの生産性が立証されたことを示している。E

PAおよびDHAの回収は、50%の量のリパーゼだけが用いられてさえも常に、リパーゼ粉末に関して表IIに示された回収と少なくとも同じであるかまたはそれより優っていた。従って、グリセリド生成物混合物中のEPA+DHA含有量は実際に非常に高い割合である44~55%の範囲で残った。加水分解副反応の程度は、表IIにおけるそれよりも僅かに高い。これは、反応内の含水量は依然として規定限界である1%よりも低いものの、固定化リパーゼには粉末リパーゼよりも高い含水量が必要とされることの結果であると思われる。

デュオライトを用いた場合と正確に同じ反応条件下における、アンバーライト上に固定化したPSLを用いた生産性研究の結果を、下記表IXに示す。

表 IX
アンバーライト上のPSLを用いた生産性研究

試行	変換%	EPA			DHA		
		面積%	重量%	面積%	面積%	重量%	面積%
		EE	EE	GL	EE	EE	GL
1	48.2	2.3	6.6	30.1	3.1	15.0	16.3
2	48.6	2.5	7.5	29.6	3.1	16.2	15.2
3	49.2	2.4	7.4	29.4	3.2	16.6	16.4
4	47.6	2.6	7.1	30.8	3.2	15.6	15.7
5	45.7	2.6	6.5	31.6	3.4	14.2	17.3
6	48.8	2.7	7.8	30.7	3.5	16.8	16.8
7	48.5	2.6	7.4	30.4	3.4	16.8	15.7
8	50.1	2.8	8.6	30.1	3.0	16.7	15.3

(略号: GL = グリセリド生成物 = MG/DG/TG)

表IXから、アンバーライト上での固定化はデュオライト上での固定化よりもさらに成功したことが明らかである。同等の結果を得るための固定化リパーゼの量は、デュオライトにおいて必要とされる量（不固定化リパーゼ粉末量の十分の一）の半分だけである。例えば、24時間の反応期間の後で、8つの連続試行において

て一定程度の変換（48~50%）が得られたが、このとき、グリセリド生成物混合物のEPA+DHA組成物は常に45~47%残っていた。デュオライト調製物と比較したところ、EPAおよびDHAの回収、ならびに加水分解の程度が

類似していた(含水量は規定限界である1%より低い、表中に加水分解の結果を示していない)。

実施例 5

本研究の目的は、上述のようにしてPSLの存在下に魚油をエステル交換して製造されるグリセリド混合物のエタノリシスにおける、カンジダ・アンタラクチカ (Candida antarctica) のリパーゼ (CAL) およびマコール・メイヘイ (Mucor meihei) のリパーゼ (MML) の活性を評価することであった。

(a) グリセリドのCALエタノリシス

固定化CAL (Novo-Nordisk、SP 435、含水量1~2% ; 0.5 g) をグリセリド混合物 (2.5 g ; 約8.5ミリモルのエステル当量 ; 初期組成 ; 25.0% のEPAと15.1%のDHA、魚油のPSLに触媒されたエステル交換により製造された) と無水エタノール (0.80 g、17.4ミリモル) に添加した。得られた酵素懸濁液を窒素雰囲気下に室温で穏やかに攪拌した。適宜試料を収集し、既述のようにして分析した。反応は、22時間後に、濾過により酵素を分離して停止させた。

その結果を下記表Xに示す。

表 X

20℃におけるCALでのグリセリド混合物のエタノリシスの進行 (EE生成物)

時間 (分/時)	10分間	20分間	30分間	40分間	50分間
重量%EE	12.7	20.3	29.1	29.0	35.8
%AEPA	29.0	29.3	30.2	34.5	29.4
重量%EPA	15.4	24.6	36.8	42.6	34.2
%ADHA	5.7	6.3	6.9	6.9	7.2
重量%DHA	5.4	9.5	14.7	14.7	14.7

(続き)

時間 (分/時)	1時間	3時間	6時間	10時間	22時間
重量%EE	40.2	68.1	76.6	80.4	100.0
%AEPA	28.1	25.5	27.0	26.0	25.3
重量%EPA	47.1	72.6	83.4	83.9	98.0
%ADHA	7.1	8.2	10.3	10.4	14.8
重量%DHA	20.8	40.4	55.4	54.9	100.0

表Xは、20℃でCALを用いたグリセリド混合物のエタノリシスの進行を示している。初期グリセリド混合物中に存在するエステル群のモル当量に基づいて約2倍過剰のエタノールを使用した。エチルエステル生成物の組成だけを表中に示している。反応が進行して22時間の反応期間後に完了したことが判る。また、リパーゼはEPAとDHAの双方に対して高い活性を示したが、前者の脂肪酸、即ちEPAに対して後者よりかなり高い活性を示すことが明白である。

(b) グリセリドのMMLエタノリシス

反応条件は、上記(a)で述べたCALエタノリシス反応の条件と同一であった。固定化MML (Novo-Nordisk, Lipozyme(商標)、含水量10%; 0.5g) をグリセリド混合物 (2.5g; 約8.5ミリモルのエステル当量; 初期組成:

25%のEPAと15.1%のDHA、魚油のPSLに触媒されたエステル交換により製造された) と無水エタノール (0.80g、17.4ミリモル) に添加し

た。得られた酵素懸濁液を窒素下に室温で穏やかに攪拌した。適宜試料を収集し、既述のようにして分析した。反応は、27時間後に、濾過により酵素を分離して停止させた。

前記CAL反応において使用したと同じグリセリド試料の、20℃でMMLを用いたエタノリシスの進行を下記表XIに示す。

表 XI

20℃におけるMMLでのグリセリド混合物のエタノリシスの進行

時間	1時間	2時間	3時間	6時間	9時間	12時間	27時間
変換%	15.8	21.7	25.4	33.7	39.5	43.0	50.1
エチルエステル:							
面積%EPA	25.4	28.7	30.4	32.1	31.5	32.3	28.4
(w/w)%EPA	14.4	24.1	27.5	39.3	47.1	50.2	55.0
面積%DHA	3.7	2.9	3.7	5.0	5.5	6.6	6.3
(w/w)%DHA	4.0	4.7	6.4	11.2	15.2	16.7	21.7
残余 MG/DG/TG							
面積%EPA	26.4	26.5	30.1	23.1	21.8	20.8	20.9
(w/w)%EPA	85.6	75.9	72.5	60.7	52.9	49.8	45.0
面積%DHA	18.3	20.9	23.2	23.2	23.0	22.9	24.9
(w/w)%DHA	96.0	95.7	93.6	88.8	86.8	83.3	78.3

表XIから、MMLが、EPA/DHAに富むグリセリドのエタノリシス反応においてEPAとDHAとの区別をかなりな程度に示すことは明白である。27時間の反応期間後、50%変換時点で、約80%の初期DHA含量が残余グリセリド混合物中に残っている。EPAの分布は好都合というほどのものではなく、エチルエステル中に55%、そして依然としてグリセリド残物中に45%であった。これは、類似の条件にグリセリド残物に対して2回目のエタノリシスを試行することにより改善し得る。また、MMLの活性は、この方法論により、EPAに富

む魚油を使用してEPAを製造する可能性、ならびに（マグロ油のような）DHAに富む魚油を使用してDHAを製造する可能性を提供することにも着目すべきである。

実施例 6

本研究の目的は、本発明の方法が植物および蔬菜油に適用可能であることを例証することであった。

アラキドン酸抽出物 (AA) の P S L に触媒されるエタノリシス

プロノバ・バイオケア (Pronova Biocare) 社から調達した、アラキドン酸 (AA、20:4 n-6) を 31.1% 含有するアラキドン酸抽出物を、魚油について実施例 1 にて述べた方法 (即ち 10% P S L 粉末、20℃、50% 変換、24 時間) に従い処理した。

その結果を下記表 XIII に示す。

表 XIII

クラス	重量%クラス	面積% AA	重量% AA
EE	50	7.6	12
FFA	2	23.3	1
MG	17	49.0	24
DG	24	57.4	47
TG	8	58.9	16
MG/DG/TG	49	54.2	87

表 XIII は、50% 変換における 87% というグリセリド混合物中の AA の非常に高い回収を示したが、これは、相応する魚油反応における EPA よりも低いものの DHA よりも高い値である。加水分解副反応の程度は、魚油研究におけると

同等の 2% であった。グリセリド生成物混合物の AA 含量は 54.2% であった。驚くべきことに、これは TG 画分において最高であり、そして MG 画分において最低であった。

【図1】

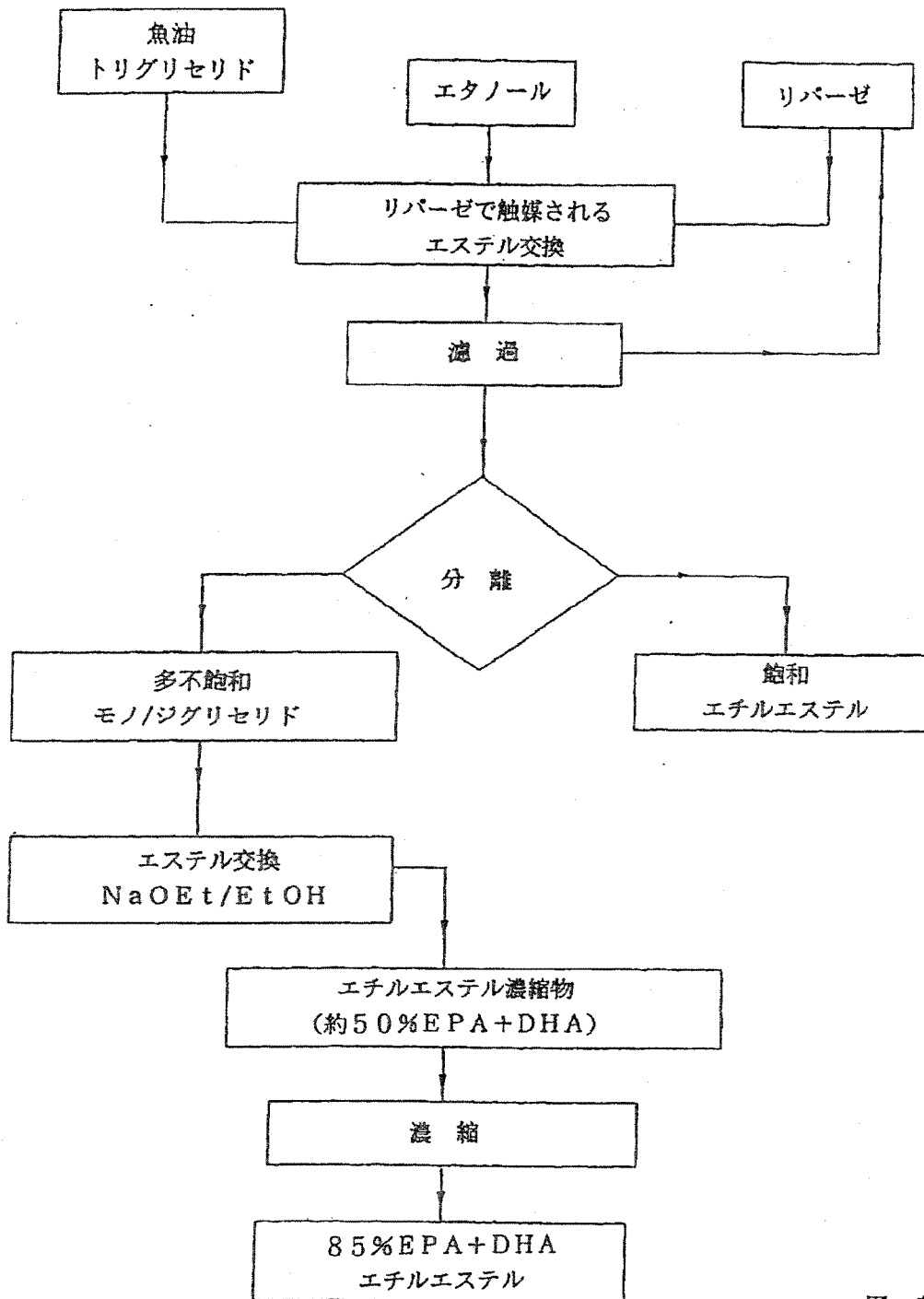


図 1

85%EPA+DHAエチルエステル濃縮物の製造

【図2】

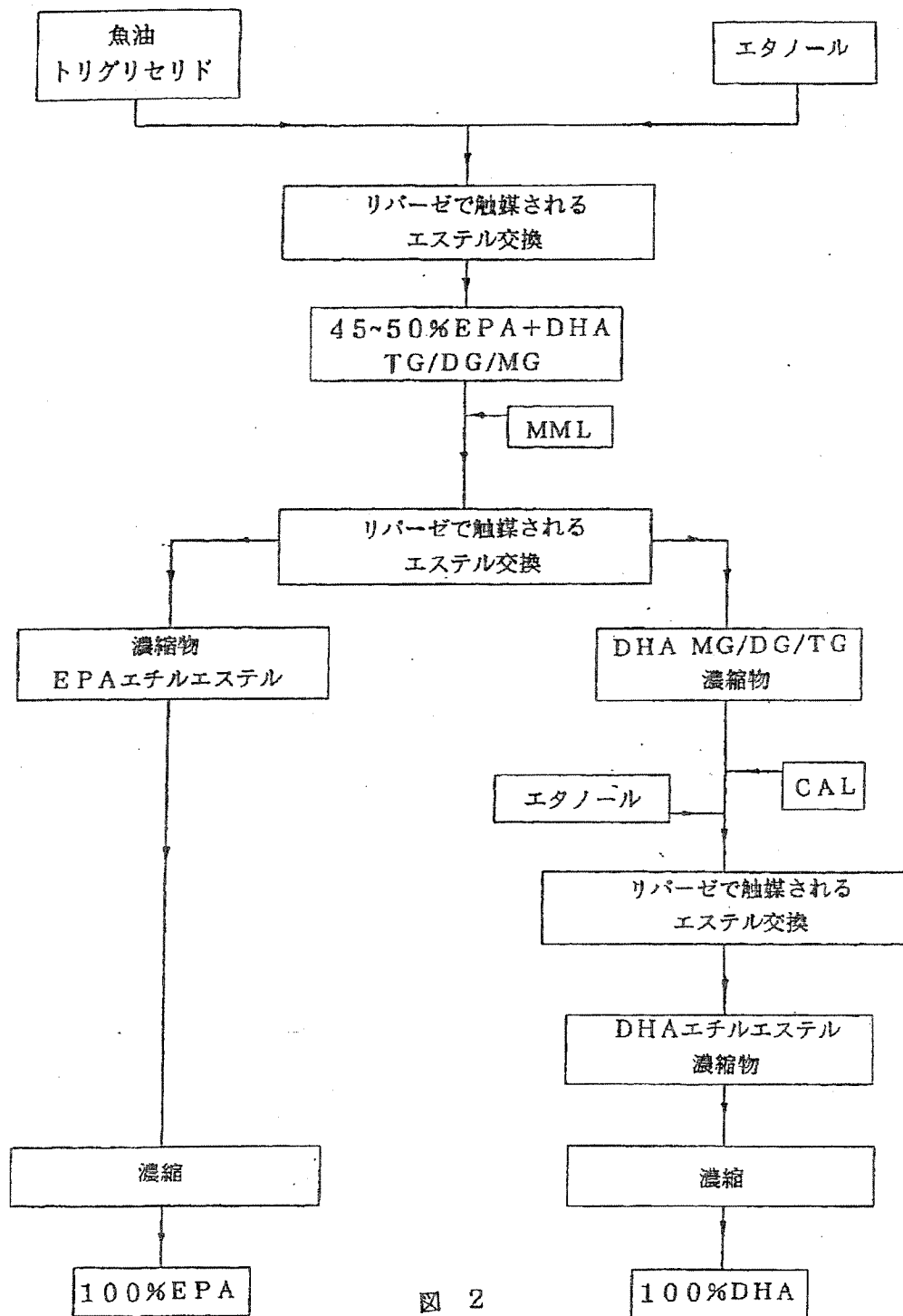


図 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NO 95/00050

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC6: C11C 3/02, C11C 3/06, C07C 69/58, C12P 7/62, C12P 7/64 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C11C, C07C, C12D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, A1, 9013656 (ENZYTECH, INC.), 15 November 1990 (15.11.90)	1-23
	--	
X	WO, A1, 9116443 (NOVO NORDISK A/S), 31 October 1991 (31.10.91)	1-23
	--	
A	US, A, 4792418 (DAVID RUBIN ET AL), 20 December 1988 (20.12.88)	1-9,16-23
X		10-15
	--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 June 1995		16 -06- 1995
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Eva Johansson Telephone No. +46 8 782 23 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/NO 95/00050

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STN International, File WPIDS, WPIDS accession no. 94-174015, KANEBUCHI KAGAKU KOGYO KK: "Method to concentrate docosa-hexa enoic acid contained in oil - comprises alcoholysis in presence of lipase to remove other fatty acids as lower alkyl ester", JP 06116585, A, 940426 (9421) 5 pp --	1-9
A	STN International, File CA, Chemical Abstracts, volume 119, no. 13, 27 September 1993 (Columbus, Ohio, US), Li, Zuyi et al: "Lipase -catalyzed alcoholysis to concentrate the n-3 polyunsaturated fatty acid of cod liver oil", abstract no. 137911, & Enzyme Microb. Technol. (1993), 15(7), 601-6 --	1-23
A	STN International, File CA, Chemical Abstracts, volume 119, no. 8, 23 August 1993 (Columbus, Ohio, US), Adachi, Shuichi et al: "Acidolysis of sardine oil by lipase to concentrate eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in glycerides", abstracts no. 7603, & J. Ferment. Bioeng. (1993), 75(4), 259-64 --	1-23
A	STN International, File CA, Chemical Abstracts, volume 113, no. 17, 22 October 1990 (Columbus, Ohio, US), Hoshino, Tamotsu et al: "Bioreactor for enzymic reaction of fat and fatty acid derivatives. Part XII. Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids", abstract no. 151058, & Agric.Biol. Chem.(1990), 54(6), 1459-67 --	1-23
A	STN International, File WPIDS, WPIDS accession no. 89-337042, NIPPON OILS & FATS CO LTD: "Concn. of unsaturated fatty acid ester - involves transesterification with oil -fat hydrolase", JP 01252294, A, 891006 (8946) 2 pp --	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NO 95/00050

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STN International, File WPIDS, WPIDS accession no. 87-153954, NISSHIN OIL MILLS LTD: "Polyunsaturated fatty acid glyceride prodn. - by reacting the acid or its ester with glycerine in presence of heat stable lipase", JP 62091188, A, 870425 (8722) 5 pp —	1-23
A	STN International, File WPIDS, WPIDS accession no. 86-010454, ASAHI DENKA KOBYO KK: "Fatty acid alcohol ester prepn. - by hydrolysing suitable fat and esterification or ester exchange", JP 60234588, A, 851121 (8602) 5 pp —	1-23
A	Patent Abstracts of Japan, Vol 8, No 98, C-221, abstract of JP, A, 84-14793 (NIPPON OIL & FATS CO LTD), 25 January 1984 (25.01.84) — -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

03/05/95

International application No.
PCT/NO 95/00050

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A1-	9013656	15/11/90	NONE		
WO-A1-	9116443	31/10/91	EP-A-	0528844	03/03/93
US-A-	4792418	20/12/88	EP-A-	0347509	27/12/89
			AU-B-	597180	24/05/90

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 1 B 7/00		9547-4H	C 1 1 B 7/00
C 1 1 C 3/04		9547-4H	C 1 1 C 3/04
		9547-4H	3/10
C 1 2 P 7/64		9637-4B	C 1 2 P 7/64

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, M W, MX, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN